

Potencijal bakterija za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih sirovina

Sažetak

Poljoprivreda, šumarstvo i prehrambena industrija izvori su velike količine lignocelulozne biomase, koja može poslužiti kao lako dostupna i jeftina obnovljiva sirovina za dobivanje različitih bioproizvoda. Jedan od takvih proizvoda je i bioetanol. Ovaj rad daje pregled bakterija koje se koriste i/ili istražuju za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. U navedenim istraživanjima proizvodnje bioetanol pomoću bakterija primijenjuju se različiti pristupi kako bi se povećala ekološka i ekonomska efikasnost procesa. Pored uobičajenih bioprocasa, koji se provode u više faza i uz pomoć monokulture, razvijaju se i visokointegrirani (konsolidirani) bioprocasi uz primjenu mikrobnih kokultura.

Glavne riječi: bioetanol, lignoceluloza, bakterije, heksoze, pentoze, inhibitori

Uvod

Trenutno industrijom biogoriva dominira bioetanol, a sirovine za njegovu proizvodnju mogu biti lignocelulozni materijali (sastavljeni od 10-35 % lignina, 20-40 % hemiceluloze i 25-50 % celuloze), npr. ostaci od poljoprivrede i drvne industrije koji predstavljaju obnovljive izvore energije (Ioelovich, 2014; Koppolu i Vasigala, 2016). Zbog kristalične strukture celuloze te kompleksne strukturne organizacije celuloze, hemiceluloze i lignina, lignocelulozni materijali su teško razgradivi. Stoga je neophodan korak u većini procesa predobrada (fizikalna, fizikalno-kemijska, kemijska ili biološka), koja se obično provodi prije samog biotehnološkog procesa te ovisi o vrsti lignoceluloznog materijala i željenom proizvodu (Janušić i sur., 2008; Mood i sur., 2013; Putro i sur., 2016; Chen i sur., 2017; Kumar i Sharma, 2017).

Hidrolizom lignoceluloznih sirovina oslobađaju se različiti šećeri pa se tako hidrolizom celuloze dobiva glukoza, dok se hidrolizom hemiceluloze dobiva smjesa heksoza (glukoza, manosa, galaktoza) i pentoza (ksiloza, ramnoza, arabinoza). Navedeni šećeri se potom fermentiraju u etanol, a lignin predstavlja sekundarni produkt. Tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina, posebno u slučaju kiseline predobrade, pored oslobađanja šećera dolazi i do nastajanja niza inhibitora. Radi se o nusproduktima razgradnje složenih ugljikohidrata i lignina, toksičnim za radne mikroorganizme. Stoga ovi spojevi negativno utječu na efikasnost bioprocasa (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000a,b).

Zbog navedenih činjenica postoji potreba za pronalazanjem novih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina, ali i za odabirom prikladnih radnih mikroorganizama (izoliranih iz prirode ili genetički modificiranih). Pred potencijalne mikroorganizme postavljaju se mnogobrojni zahtjevi za proizvodnju bioetanol kao što su mogućnost korištenja jeftine hranjive podloge,

¹ Izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić-Tominac i prof. dr. sc. Božidar Šantek, Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

² Martina Tolvajčić, sveučilišna prvostupnica inženjerka biotehnologije i studentica diplomskog studija Upravljanje sigurnošću hrane, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

³ Izv. prof. dr. sc. Damir Stanzer, izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić i mag. ing. Karla Hanousek Čiča, Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: vpetrav@pbf.hr

učinkovitost preko 90 % (omjer stvarnog i teorijskog koeficijenta konverzije supstrata u produkt), velika produktivnost (preko 1 g/Lh), tolerancija na visoke koncentracije bioetanol, mogućnost konverzije više različitih šećera, sposobnost fermentacije nerazrijeđenih hidrolizata, otpornost na inhibitore, kao i rast u uvjetima nepovoljnim za kontaminante (kiselo područje pH-vrijednosti ili pri većim temperaturama) (Dien i sur., 2003; Akinosho i sur., 2014; Koppolu i Vasigala, 2016). Ne postoji radni mikroorganizam koji bi udovoljavao svim ovim zahtjevima, ali je moguće metodama genetičkog inženjerstva uz primjenu različitih strategija dobiti nove sojeve poboljšanih karakteristika (Akinosho i sur., 2014).

Izuzetno važno mjesto među radnim mikroorganizmima za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih sirovina zauzimaju kvasci zbog dobrih proizvodnih svojstava i tolerancije na stres (Weber i sur., 2010; Binod i sur., 2013). Među kvascima korištenim za industrijsku proizvodnju bioetanol najčešći su oni koji pripadaju rodu *Saccharomyces*, dok se u budućnosti očekuje da će sve veću komercijalnu primjenu imati kvasci iz roda *Pichia* (*Scheffersomyces*). Također su istraživani kvasci *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* te vrste iz rodova *Candida* i *Pachysolen* (Petraović-Tominac i sur., 2017). Pored primjene kvasaca, istražuju se mogućnosti primjene nekih bakterija te više vrsta filamentoznih funga za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih hidrolizata (Binod i sur., 2013).

Pored ranijeg načina provođenja procesa proizvodnje bioetanol, koji podrazumijeva odvojeno provođenje pojedinih faza procesa, u novije vrijeme razvijaju se tzv. visokointegrirani (konsolidirani) bioprocеси (eng. Consolidated Bioprocessing, CBP), koji nastoje zaobići kritične faze procesa, kako bi se postigle značajne uštede u proizvodnji. Stoga konsolidirani bioprocеси kombiniraju predobradu, saharifikaciju i fermentaciju unutar jednog bioreaktora radi smanjenja operativnih troškova, povećanja učinkovitosti konverzije i smanjenja inhibicije. U navedenim bioprocесima istražuju se mogućnosti primjene čistih kultura bakterija, ali i bakterijskih kokultura ili kokultura bakterija i kvasaca, pri čemu je važno odabrati optimalnu kombinaciju radnih mikroorganizama (Svetlitchnyi i sur., 2013; Ivančić Šantek i sur., 2016). U konsolidiranim bioprocесima radni mikroorganizam ili kokultura proizvode enzime za hidrolizu celuloze i hemiceluloze iz lignocelulozne biomase te fermentiraju oslobođene pentoze i heksoze u bioetanol bez dodavanja celulolitičkih ili hemicelulolitičkih enzima (Svetlitchnyi i sur., 2013).

Cilj ovog rada je dati pregled bakterija koje se koriste i/ili istražuju za hidrolizu i/ili fermentaciju lignoceluloznih sirovina pri proizvodnji bioetanol. Bit će opisani samo najvažniji rodovi i vrste, a to su bakterije iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*, vrste *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum* te neke termofilne bakterije. Pored mogućnosti primjene u bioprocесima s odvojenom hidrolizom i fermentacijom, obratit će se pozornost na potencijal ovih bakterija za razvoj specifičnih konsolidiranih bioprocеса. Zbog kompleksnosti tematike istraživanja, primjene bakterija vrste *Klebsiella oxytoca*, cijanobakterija i nekih drugih vrsta bakterija nisu detaljnije razrađene u ovom radu jer se radi o preopsežnim temama.

Najvažnije bakterije koji se istražuju i koriste za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih sirovina

Bakterije roda *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velika i raznolika skupina bakterija, koje su uglavnom saprofitske, a koriste se za industrijsku proizvodnju enzima, insekticida i antibiotika. Vrste iz ovog roda su Gram-pozitivni, fakultativni ili obligatni anaerobi štapičastog oblika, koji mogu koristiti različite supstrate pri čemu nastaju različiti proizvodi fermentacije. Osim heksoza, određene vrste roda *Bacillus* mogu koristiti i arabinozu, ksilozu, škrob, rafinozu i trehalozu te mogu proizvesti značajne količine etanol, acetata i 2,3-butandiola (Dufour i sur., 2011).

Ezebuio i sur. (2015) navode mogućnost proizvodnje bioetanola pomoću bakterije *Bacillus cereus* GBPS9 na bagasi šećerne trske (ostatak od proizvodnje šećera iz šećerne trske) i kori kasave (manioke). Eksperiment je proveden u laboratorijskom mjerilu, a sirovine su prethodno obrađene optimalnim metodama koje su za svaku od njih bile različite. Ire i sur. (2016) su istraživali simultanu saharifikaciju i kofermentaciju (eng. simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF) pomoću kokulture celulolitičke bakterije *Bacillus cereus* GBPS9 (VCE-19) i ksilanolitičke bakterije *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki HD1 (VXE-41). Bagasa je prethodno obrađena parnom eksplozijom, a kao izvor dušika korišten je kvašičev ekstrakt. Fermentacija je provedena tijekom 7 dana pri optimalnim procesnim uvjetima (pH 7, 40 °C) i na kraju procesa bilo je prisutno najviše etanola (19.08 g/L), a pored toga su bili prisutni i etil-acetat (8.75 g/L), octena kiselina (6.53 g/L), *n*-propanol (4.96 g/L), izobutanol (3.73 g/L) i aceton (3.49 g/L).

Unutar roda *Bacillus* postoje brojne termofilne vrste koje mogu imati poseban industrijski značaj jer su također otpornije i na druge vrste stresa poput izloženosti inhibitorima i teškim metalima (Wiegel i sur., 1979; Wiegel i Ljungdahl, 1981; Dufour i sur., 2011). Termofilna bakterija *Bacillus stearothermophilus* koristi velik broj supstrata za proizvodnju etanola (Sharp i sur., 1980), uključujući škrob, arabinozu, ksilozu i sorbitol. Problem su relativno niski prinosi etanola (Atkinson i sur., 1975), iako je sposobnost fermentacije *B. stearothermophilus* u nekim kasnijim istraživanjima značajno poboljšana (Payton, 1984; Pennock i Tempest, 1988). *B. stearothermophilus* također proizvodi mnoštvo enzima koji razgrađuju lignoceluloznu biomasu te može brzo rasti pri velikim temperaturama pa je stoga zanimljiv za proizvodnju biogoriva (Nanmori i sur., 1990; Dufour i sur., 2011). Bhatt i Bhatt (2014) su opisali primjer laboratorijske primjene kokulture termofilne celulolitičke bakterije *Bacillus stearothermophilus* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnju bioetanola iz kiselinski obrađene ljuške kikirikija. Opisana kokultura provodi simultanu saharifikaciju i fermentaciju (eng. Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF).

Bakterije roda *Clostridium*

Vrste roda *Clostridium* su Gram-pozitivni štapičasti obligatni anaerobi (Dufour i sur., 2011) koji zahvaljujući svojim ekstracelularnim enzimima mogu koristiti širok spektar ugljikohidrata, uključujući polimerne supstrate poput celuloze, hemiceluloze i škroba (Mitchell, 1998). Neke biotehnoški značajne vrste iz ovog roda provode aceton-butanol-etanolnu fermentaciju (eng. acetone-butanol-ethanol fermentation, ABE fermentation), pri čemu također nastaju i drugi proizvodi (Maddox, 1989; Dufour i sur., 2011).

Bakterija *Clostridium cellulolyticum* može razgraditi i koristiti kristaličnu celulozu, a pritom kao tri glavna proizvoda fermentacije nastaju acetat, etanol i laktat. Obzirom da se lako može provesti genetička modifikacija bakterija iz roda *Clostridium*, to otvara mogućnost unaprjeđenja bioprocesa u kojem se celuloza može prevesti u etanol u jednom stupnju (Dufour i sur., 2011).

Optimalna temperatura rasta bakterije *Clostridium phytofermentans* je 35-37 °C pri pH 6-9 (Warnick i sur., 2002). *C. phytofermentans* provodi saharifikaciju i fermentaciju raznih polisaharida (npr. celuloze, pektina, poligalakturonske kiseline, škroba, ksilana), oligosaharida (npr. celobioze, genciobioze, laktoze, maltoze) i monosaharida poput heksoza (npr. glukoze, fruktoze, galaktoze, manoze) i pentozna (npr. arabinoze i ksiloze). Pritom kao glavni krajnji produkti fermentacije nastaju etanol i male količine acetata, formijata, laktata i vodika (Maki i sur., 2009; Weber i sur., 2010).

Tvrtka za proizvodnju bioetanola Qteros iz SAD-a komercijalno primjenjuje bakteriju *Clostridium phytofermentans* (komercijalni naziv Q Microbe™) u konsolidiranom bioprocesu, koji uključuje simultano provođenje hidrolize polisaharida i fermentacije u istom fermentoru, čime

se smanjuju troškovi. Ova bakterija proizvodi bioetanol kao primarni proizvod metabolizma, dok octena i mliječna kiselina nastaju u puno manjim koncentracijama (Leschine i Warnick, 2010; Qteros, 2017). Q Microbe[®] uspješno koristi različite vrste lignocelulozne biomase te se stoga mogu primijeniti sirovine koje su na određenoj lokaciji trenutno dostupne i ekonomski najpovoljnije.

Osim spomenutog komercijalnog postupka proizvodnje bioetanola u monokulturi, istražuje se primjena bakterije *C. phytofermentans* u kokulturi s drugim mikroorganizmima. Proizvodnja bioetanola iz α -celuloze pomoću kokulture bakterije *C. phytofermentans* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* cdt-1, koji fermentira celodekstrin, nekoliko je puta veća nego primjenom monokultura ovih dvaju mikroorganizama. Pritom bakterija *C. phytofermentans* istodobno provodi hidrolizu i fermentaciju, a budući da je brzina hidrolize ograničavajući faktor u ovom bioprocusu, konverzija α -celuloze u bioetanol povećana je dodatkom celulaze (Zuroff i sur., 2013).

Clostridium je velik i vrlo raznolik rod bakterija koji trenutno obuhvaća preko 200 dobro opisanih bakterijskih vrsta, od kojih su samo oko 15 termofili. Većina termofilnih vrsta roda *Clostridium* ima optimalnu temperaturu rasta u rasponu 45 - 65 °C. Najčešće korištena termofilna etanologena vrsta iz roda *Clostridium* je bakterija *Clostridium thermocellum*, koja razgrađuje kristalnu celulozu (Scully i Orlygsson, 2015) i zahvaljujući svom celulosomu može brzo razgraditi celulozu i proizvesti bioetanol (Mbaneme-Smith i Chinn, 2015). Neke mezofilne vrste iz roda *Clostridium*, kao npr. *Clostridium acetobutylicum* (Sabathe i sur., 2002) i *Clostridium cellovorans* također posjeduju celulosom (Tamaru i sur., 2010). Celulosomi su multi-enzimski kompleksi koji razgrađuju polisaharide staničnih stijenki biljaka (Mbaneme-Smith i Chinn, 2015).

Bakterija *Clostridium thermocellum* je termofilna vrsta s temperaturnim optimumom 50 - 68 °C, čiji divlji sojevi proizvode do 3 g/L, a toleriraju 5 g/L etanola, dok su pri većim koncentracijama značajno inhibirani. Stoga se provode njihove genetičke modifikacije radi povećanja otpornosti na etanol, ali i na druge inhibitore. Međutim, povećanje tolerancije na inhibitore može biti popraćeno manjom brzinom rasta, neprikladnom za realne procese (Akinosho i sur., 2014). Zahvaljujući svom celulosomu, bakterija *C. thermocellum* može brzo razgraditi celulozu i proizvesti etanol. Budući da je *C. thermocellum* anaerobna termofilna bakterija, ona ne treba aeraciju i nema opasnosti od većine kontaminanata pa dobro fermentira i u nesterilnim podlogama. Pored toga, prednost ovakvog termofilnog radnog mikroorganizma u odnosu na mezofilne bakterije su manji operativni troškovi izdvajanja bioetanola i hlađenja bioreaktora zbog veće temperature (Mbaneme-Smith i Chinn, 2015). Nadalje, iako koristi samo heksoze, bakterija *C. thermocellum* se također može primijeniti u kokulturama s drugim mikroorganizmima koji istovremeno koriste heksoze i pentoze (Akinosho i sur., 2014). Zahvaljujući navedenim činjenicama, bakterija *C. thermocellum* je u posljednje vrijeme predmet povećanog interesa kao kandidat za primjenu u različitim konsolidiranim bioprocusima (Akinosho i sur., 2014; Mbaneme-Smith i Chinn, 2015).

Bakterija *Escherichia coli*

Sojevi Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* mogu koristiti razne izvore ugljika (uključujući šećere i šećerne alkohole) u aerobnim i anaerobnim uvjetima te su prikladni za razne bioprocuse (Koppolu i Vasigala, 2016). Bakterija *Escherichia coli* je modelni organizam čija je uporaba dovela do velikog napretka molekularne biologije i mikrobiologije (Kellogg i Shaffer, 1993; Dufour i sur., 2011). Obzirom na veliko znanje o genomu i metabolizmu bakterije *E. coli*, kao i iskustvo s njezinim genetičkim modifikacijama (Koppolu i Vasigala, 2016) te sposobnost korištenja heksoza i pentoza (Dufour i sur., 2011; Weber i sur., 2010) ova se bakterija može razmatrati kao jedan od potencijalnih mikroorganizama za proizvodnju biogoriva iz lignocelulozne biomase.

Kao i ostale vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, bakterija *E. coli* pri anaerobnim uvjetima provodi fermentacije u kojima uz etanol nastaju mliječna, octena, mravlja i jantarna kiselina (tzv. fermentacija mješovitog tipa, eng. mixed acid fermentation; Dufour i sur., 2011). Kako bi se povećao prinos bioetanola proizvedenog tijekom fermentacije mješovitog tipa, provedena je genetička modifikacija bakterije *E. coli* u kojoj su korišteni geni iz bakterije *Zymomonas mobilis*. Bila je to jedna od prvih uspješnih primjena metaboličkog inženjerstva i dobiveni su obećavajući rezultati, a kasnije su dobiveni brojni genetički modificirani sojevi *E. coli* s različitim sposobnostima proizvodnje bioetanola uz korištenje različitih supstrata (Dufour i sur., 2011; Koppolu i Vasigala, 2016). Iako je postignut značajan napredak, još uvijek nije postignut dovoljno ekonomičan bioproces u kojem bi se bakterija *E. coli* koristila kao radni mikroorganizam za komercijalnu proizvodnju bioetanola i nekih drugih biogoriva. Unatoč povećanju koncentracije proizvedenog bioetanola, koje je postignuto primjenom nekih konstruiranih sojeva *E. coli*, problem su inhibitori koji potječu iz lignoceluloznih sirovina i negativno utječu na rast ove bakterije. Rješenje ovog problema moglo bi biti poboljšanje metoda predobrade i metode genetičkog inženjerstva (Koppolu i Vasigala, 2016). Pozitivni pomaci u rješavanju problema slabe tolerancije prema etanolu postignuti su postupnom adaptacijom stanica (njihovim izlaganjem povećanim koncentracijama etanola) (Yomano i sur., 1998) te primjenom imobilizacije stanica na poroznim staklenim mikrokuglicama (Zhou i sur., 2008; Dufour i sur., 2011). Jedan od problema koji bi smanjio rast bakterije *E. coli* može biti osmotski stres, do kojeg dolazi zbog uporabe velikih koncentracija šećera. Ovaj problem može se prevladati dodavanjem osmolita (osmoprotektanata), ali uz povećanje ukupne cijene proizvodnje bioetanola (Koppolu i Vasigala, 2016).

Bakterija *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis je Gram-negativna bakterija koja je privukla pozornost razvojem tehnologije proizvodnje bioetanola. Velik prinos bioetanola i velika produktivnost rezultati su jedinstvenih fizioloških osobina ove bakterije (Weber i sur., 2010). Unatoč nekim prednostima, bakterija *Z. mobilis* nije dobro prilagođena za konverziju lignoceluloze budući da može fermentirati samo glukozu, fruktozu i saharozu, ali ne i šećere poput ksiloze i arabinoze. Stoga se pokušalo s različitim genetičkim modifikacijama kako bi se omogućilo korištenje ksiloze (Zhang i sur., 1995) i arabinoze (Deanda i sur., 1996). Bakterija *Z. mobilis* troši šećere određenim redoslijedom te najbrže fermentira glukozu, zatim ksilozu i potom arabinozu. Genetička modifikacija bakterije *Z. mobilis* omogućila je korištenje celobioze (Yanase i sur., 2005). Značajan problem koji se javlja u modificiranim sojevima koji koriste pentoze je niska tolerancija prema octenoj kiselini koja se često nalazi u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Mohagheghi i sur., 2002).

Kako bi povećala produktivnost u procesu proizvodnje bioetanola iz biomase pomoću bakterije *Z. mobilis*, tvrtka DuPont je patentom zaštitila inovaciju kontrole bakterijskih kontaminacija stabiliziranim klorovim dioksidom (Leana i Lefebvre, 2014). Krajem 2015. godine ista tvrtka je otvorila postrojenje za proizvodnju bioetanola (Nevada, Iowa, SAD) za koje se navodi da je najjeftinije tog tipa u svijetu. Radni mikroorganizam je modificirani soj bakterije *Z. mobilis*, koji fermentira heksoze i pentoze i stoga proizvodi znatno više etanola nego kvasac koji fermentira samo glukozu (Harrington, 2015), a sirovina je kukuruzovina koja se najprije podvrgava blagoj predobradi amonijakom (Anonymous 1, 2015).

Bakterija *Corynebacterium glutamicum*

Bakterija *Corynebacterium glutamicum* je nepatogena, Gram-pozitivna bakterija, poznata kao mikroorganizam za industrijsku proizvodnju aminokiselina i nukleinskih kiselina (Sasaki i sur., 2009; Weber i sur., 2010). U uvjetima nedostatka kisika ova bakterija ne raste, ali proizvodi

značajne količine mliječne, jantarne i octene kiseline te je u takvim uvjetima također vrlo otporna na fenole, furane i druge inhibitore koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloze. Ova Gram-pozitivna bakterija je modificirana uvođenjem gena iz bakterije *Z. mobilis* na takav način da modificirani soj bakterije bez prisutnosti kisika uz laktat, sukcinat i acetat počne iz glukoze proizvoditi i etanol. Zahvaljujući tome, najprije se u aerobnim uvjetima uzgoji odgovarajuća koncentracija biomase genetički modificirane bakterije *C. glutamicum*, a potom se promjenom uvjeta postigne manjak kisika, zbog čega stanice proizvode etanol (Inui i sur., 2004). Zbog otpornosti na inhibitore može se izbjeći detoksikacija, što otvara mogućnost jeftinijeg i jednostavnijeg postupka proizvodnje bioetanola (Sakai i sur., 2007).

Većina sojeva bakterije *C. glutamicum* ne koristi pentoze (Kawaguchi i sur., 2009), stoga je uvođenjem odgovarajućih gena iz bakterije *E. coli* postignuto da modificirani sojevi *C. glutamicum* mogu koristiti arabinozu i ksilozu pri aerobnim i anaerobnim uvjetima (Kawaguchi i sur., 2006, 2008) te je kasnijim modifikacijama potrošnja obaju šećera dodatno povećana (Sasaki i sur., 2009). Zanimljivo je da prisutnost glukoze nije utjecala na istovremenu potrošnju ksiloze i arabinoze, što predstavlja prednost u usporedbi s drugim bakterijama, npr. s bakterijom *E. coli*. Kasnije je konstruiran soj *C. glutamicum* koji u podlozi sa smjesom šećera može istovremeno potpuno potrošiti glukozu, ksilozu, arabinozu i celobiozu u anaerobnim uvjetima (Sasaki i sur., 2009).

Termofilne bakterije

Termofilne bakterije posjeduju mnoga svojstva koja mogu predstavljati prednost pri proizvodnji bioetanola druge generacije (Scully i Orlygsson, 2015). One razgrađuju puno veći raspon ugljikohidrata nego kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i bakterija *Zymomonas mobilis*, a također su manji zahtjevi vezani uz miješanje, hlađenje ili zagrijavanje tijekom njihovog uzgoja. Osim toga, moguće je izravno (*in situ*) izdvajanje bioetanola vakuum destilacijom iz fermentacijske smjese. Osim širokih raspona radnih temperatura, termofili često podnose ekstremne pH-vrijednosti i velike koncentracije soli tijekom fermentacije te nemaju velike nutritivne zahtjeve. Također se smatraju sigurnima sa stajališta ljudskog zdravlja (eng. generally recognized as safe, GRAS). Iz perspektive biotehnološkog procesa, pri povišenim temperaturama se miješanje lakše provodi zbog smanjene viskoznosti, može se koristiti veća koncentracija supstrata (eng. increased substrate loadings), brzine prijenosa mase su veće, a rizik rasta mezofilnih kontaminanata je manji. Termofilni anaerobi mogu proizvesti etanol iz različitih supstrata, a neke od ovih vrsta razgrađuju biopolimere kao što su škrob, celuloza i ksilan. Umjereni termofili imaju optimalne temperature rasta 50 - 64 °C, ekstremni termofili 65 - 79 °C, a hipertermofili rastu optimalno pri temperaturama većim od 80 °C (Scully i Orlygsson, 2015). Pored termofilnih vrsta navedenih u ranijim poglavljima, istražuju se i mnoge druge termofilne bakterije poput pripadnika rodova *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermomonospora*, *Anaerocellum*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Caloramator* itd. (Lynd i sur., 2002; Weber i sur., 2010; Scully i Orlygsson, 2015).

Dosadašnja istraživanja pokazala su daleko manju brzinu proizvodnje bioetanola pomoću termofilnih bakterija nego pomoću kvasca *S. cerevisiae* ili bakterije *Z. mobilis*. Uz malu brzinu konverzije glukoze, značajno ograničenje većine termofilnih mikroorganizama je njihova mala tolerancija prema etanolu, a do sada postignuta poboljšanja sojeva još uvijek ne zadovoljavaju zahtjeve industrijske proizvodnje (Weber i sur., 2010).

U literaturi se anaerobna termofilna celulolitička bakterija *Clostridium thermocellum* navodi kao najpogodniji radni mikroorganizam za termofilne konsolidirane bioprocese (Svetlitchnyi i sur., 2013). No budući da ona ne može fermentirati pentoze, istražuje se primjena *C. thermocellum* u kokulturi s drugim termofilnim etanologenim bakterijama koje to mogu (npr. bak-

terijama iz rodova *Thermoanaerobacterium* i *Thermoanaerobacter*), kako bi se povećao prinos bioetanola iz celuloze i hemiceluloze. Ovo još uvijek nije istraženo na realnim lignoceluloznim sirovinama u industrijskim uvjetima te također ima vrlo malo podataka o kokulturama bakterije *C. thermocellum* s ostalim bakterijama u laboratorijskom mjerilu (Svetlitchnyi i sur., 2013).

Smatra se da bi provođenje konsolidiranih bioprocasa pri ekstremno visokim temperaturama (> 70 °C) moglo imati prednosti u odnosu na mezofilne i termofilne (50 - 60 °C) uvjete (Svetlitchnyi i sur., 2013). Stoga su istraživane izuzetno termofilne celulolitičke bakterije iz roda *Caldicellulosiruptor*, čija je optimalna temperatura za rast preko 70 °C i imaju velike hidrolitičke sposobnosti, te metaboliziraju pentoze i heksoze. Ove bakterije mogu rasti na prethodno tretiranim ili netretiranim lignoceluloznim materijalima, ali proizvode malo bioetanola. Međutim, pokazalo se da novoizolirani soj *Caldicellulosiruptor* sp. DIB 004C, za razliku od većine vrsta iz navedenog roda, može proizvesti neočekivano velike količine bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. Polazište za razvoj visokointegriranog komercijalnog procesa proizvodnje bioetanola pri vrlo visokim temperaturama (iznad 70 °C) mogla bi biti kokultura ekstremno termofilnih bakterija kao npr. *Caldicellulosiruptor* sp. DIB 004C i odgovarajuće necelulolitičke bakterije iz roda *Thermoanaerobacter* koja hidrolizira hemicelulozu (npr. ksilan) i fermentira pentoze i heksoze u bioetanol kao glavni fermentacijski produkt. Pri razvijanju ovakvih konsolidiranih bioprocasa važno je pronaći odgovarajuću kombinaciju sojeva u kokulturi koja daje optimalne rezultate za proizvodnju bioetanola u industrijskom mjerilu (Svetlitchnyi i sur., 2013).

Zaključci

Premda se lignocelulozna biomasa smatra pogodnom obnovljivom sirovinom za proizvodnju bioetanola, da bi se postigla održiva industrijska proizvodnja potrebno je još savladati niz tehnoloških izazova, ali i odabrati prikladan radni mikroorganizam. Iako kvasac *S. cerevisiae* još uvijek zauzima posebno važno mjesto među mikroorganizmima koji proizvode bioetanol, istraživanja obuhvaćaju i brojne bakterije, među kojima su najvažnije bakterije iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*, vrste *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum* te neke umjereno i ekstremno termofilne bakterije. Prema dostupnim podacima, od navedenih bakterijskih vrsta zasad su za proizvodnju bioetanola komercijalno korištene samo bakterije *Zymomonas mobilis* i *Clostridium phytofermentans*. Da bi se poboljšalo iskorištenje bioprocasa i postigla ekonomična proizvodnja primjenjuju se različiti pristupi, pa su istraživanja etanolo-genih bakterija usmjerena na selekciju, adaptaciju, imobilizaciju i genetičke modifikacije tih bakterija. Uz ranije razvijene bioprocese u kojima se različite faze provode odvojeno, značajan broj istraživanja usmjeren je na konsolidirane bioprocese, koji su jeftiniji i učinkovitiji jer kombiniraju predobradu, saharifikaciju i fermentaciju unutar jednog reaktora. U navedenim bioprocесima istražuju se mogućnosti primjene čistih kultura i kokultura pri čemu je važno odabrati optimalnu kombinaciju radnih mikroorganizama.

Napomena

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina" (br. 9158).

Literatura

Akinoshio, H., Yee, K., Close, D., Ragauskas, A. (2014) The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in Chemistry* 2014 Aug 26;2:66. eCollection 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143619/pdf/fchem-02-00066.pdf> (31.1.2018). DOI: 10.3389/fchem.2014.00066.

Anonymous 1, (2015) Largest Cellulosic Ethanol Plant in the World Opens October 30. <https://energy.gov/eere/bioenergy/articles/largest-cellulosic-ethanol-plant-world-opens-october-30> (31.1.2018).

Atkinson, A., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., Yeo, R.G. (1975) Production of alcohol by *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(9), 1375-1377. DOI: 10.1002/bit.260170914.

Bhatt, S.M.; Bhatt, S. (2014) Bioethanol production from economical agro waste (groundnut shell) in SSF mode. *Rese-*

Arch Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5(6), 1210-1218.

Binod, P., Sindhu, R., Pandey A. (2013) The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. U: Faraco, V., ur., *Lignocellulose conversion - enzymatic and microbial tools for bioethanol production*. Berlin Heidelberg, London/ New York: Springer-Verlag, str. 131-149. DOI 10.1007/978-3-642-37861-4_7

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S. (2017) A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160(1), 196-206. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.12.007.

Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., Picataggio, S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4465-4470.

Dien, B.S., Cotta, M.A., Jeffries, T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 258-266. DOI: 10.1007/s00253-003-1444-y.

Dufour, N., Swana J., Rao, R.P. (2011). Fermentation organisms for 5- and 6-carbon sugars. U: Hood, E.E., Nelson, P., Powell, R., ur., *Plant Biomass Conversion*. Chichester: John Wiley & Sons Inc., str. 157-197. DOI: 10.1002/9780470959138.ch8.

Ezebuio, V., Ogugbue, C.J., Oruwari, B., Ire, F.S. (2015) Bioethanol production by an ethanol-tolerant *Bacillus cereus* strain GBPS9 using sugarcane bagasse and cassava peels as feedstocks. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 5(4), 213. DOI: 10.4172/2155-952X.1000213.

Harrington K., (2015) Dupont's new cellulosic ethanol plant is open for business. <https://www.aiche.org/chenected/2015/11/duponts-new-cellulosic-ethanol-plant-open-business> (31.1.2018).

Inui, M., H., Kawaguchi, S., Murakami, A., Vertès, A., Yukawa H. (2004). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 243-254. DOI: 10.1159/000086705.

Ivelovich, M. (2014) Correlation analysis of enzymatic digestibility of plant biomass, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4 (3), 269-275. DOI 10.1007/s13399-013-0109-z.

Ire, F.S.; Ezebuio, V., Ogugbue C.J. (2016) Production of bioethanol by bacterial co-culture from agro-waste-impacted soil through simultaneous saccharification and co-fermentation of steam-exploded bagasse. *Bioresources and Bioprocessing*, 3:26, DOI 10.1186/s40643-016-0104-x.

Ivancić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u industriji*, 65 (1-2) 25-38. DOI: 10.15255/KUI.2014.032.

Janušić, V., Čurić, D., Krička, T., Voća, N., Matin, A. (2008). Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda*, 14 (1), 53-58.

Kawaguchi, H., Vertès, A.A., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2006) Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3418-3428. DOI:10.1128/AEM.72.5.3418-3428.2006.

Kawaguchi, H., Sasaki, M., Vertès, A.A., Inui, M., Yukawa, H. (2008) Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1053-1062. DOI 10.1007/s00253-007-1244-x.

Kawaguchi, H., Sasaki, M., Vertès, A.A., Inui, M., Yukawa, H. (2009) Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3419-3429. DOI:10.1128/AEM.02912-08.

Kellogg, E.A., Shaffer, H. (1993) Model organisms in evolutionary studies. *Systematic Biology*, 42(4), 409-414. DOI: 10.1093/sysbio/42.4.409.

Koppolu, V., Vasigala, V.K.R. (2016) Role of *Escherichia coli* in biofuel production. *Microbiology Insights* 2016(9), 29-35. DOI: 10.4137/MBI.S10878.

Kumar AK, Sharma S. (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 4(1), 7. DOI: 10.1186/s40643-017-0137-9. Epub 2017 Jan 18.

Leana, M. C.; Lefebvre, B. G. (2014) Stabilized chlorine dioxide for contamination control in *Zymomonas fermentation*. *U.S. Patent No. 8846357*.

Leschine S., Warnick T. A. (2010) Systems and methods for producing biofuels and related materials. *U.S. Patent No. 7,682,811*.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. DOI: 10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002.

Maddox, I.S. (1989) The acetone-butanol-ethanol fermentation: recent progress in technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 7(1), 189-220. DOI: 10.1080/02648725.1989.10647859.

Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5), 500-516.

Mbaneme-Smith, V.; Chinn, M.S. (2015) Consolidated bioprocessing for biofuel production: recent advances. *Energy and Emission Control Technologies*, 2015(3) 23-44. DOI: 10.2147/EECT.S63000.

Mitchell, W.J. (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by *Clostridia*. *Advances in Microbial Physiology*, 39, 31-130. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60015-6.

Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.-C., Zhang, M. (2002) Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), 885-898. DOI: 10.1385/ABAB-98-100:1-9:885.

Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami M., Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 77-93. DOI: 10.1016/j.rser.2013.06.033.

Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., Kawamura, Y. (1990) Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6669-6672.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74, 17-24. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00160-1.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25-33. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3.

Payton, M.A. (1984) Production of ethanol by thermophilic bacteria. *Trends in biotechnology*, 2(6), 153-158. DOI: 10.1016/0167-7799(84)90032-5.

Pennock, J., Tempest, D.W. (1988) Metabolic and energetic aspects of the growth of *Bacillus stearothermophilus*

in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture. *Archives of Microbiology*, 150(5), 452-459. DOI: 10.1007/BF00422286.

Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer D., Mrvčić, J., Šantek B. (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanol iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik Zaštite Bilja* 40 (5), 24-33.

Putro, J.N., Soetaredjo, F.E., Lin, S.Y., Ju, Y.H., Ismadji, S. (2016) Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances* 6 (52), 46834-46852. DOI: 10.1039/C6RA09851G.

Qteros (2017) <http://www.qteros.com/> (31.1.2018).

Sabathe, F., Belaichi, A., Soucaille, P. (2002) Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 217(1), 15-22. DOI:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11450.x.

Sakai, S., Tsuchida, Y., Okino, S., Ichihashi, O., Kawaguchi, H., Watanabe, T., Inui, M., Yukawa, H. (2007) Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2349-2353. DOI: 10.1128/AEM.02880-06.

Sasaki, M., Jojima, T., Kawaguchi, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009) Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 105-115. DOI: 10.1007/s00253-009-2065-x.

Scully, S.M., Orlygsson, J. (2015) Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies* 2015, 8 (1) 1-30. DOI:10.3390/en8010001.

Sharp, R.J., Bown, K.J., Atkinson, A. (1980) Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of *Bacillus*. *Journal of general microbiology*, 117(1), 201-210. DOI: 10.1099/00221287-117-1-201.

Svetlitchnyi, V.A., Kensch, O., Falkenhan, D.A., Korseska, S.G., Lippert, N., Prinz, M., Sassi, J., Schickor, A., Curvers, S. (2013) Single-step ethanol production from lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 6 (1), 31. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/31> (31.1.2018). DOI: 10.1186/1754-6834-6-31.

Tamaru, Y., Miyake, H., Kuroda, K., Ueda, M., Doi, R.H. (2010) Comparative genomics of the mesophilic cellulosome-producing *Clostridium cellulovorans* and its application to biofuel production via consolidated bioprocessing. *Environmental Technology*, 31(8-9), 889-903. DOI: 10.1080/09593330.2010.490856.

Warnick, T.A., Methe, B.A., Leschine, S.B. (2002) *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 1155-1160. DOI: 10.1099/00207713-52-4-1155.

Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T., Boles, E. (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1303-1315. DOI: 10.1007/s00253-010-2707-z.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., Rawson, J.R. (1979) Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of Bacteriology*, 139(3), 800-810.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. (1981) *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 128(4), 343-348. DOI: 10.1007/BF00405910.

Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O. (1998) Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* K011 for fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20(2), 132-138. DOI: 10.1038/sj.jim.2900496.

Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., Picataggio, S. (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267, 240-243. DOI: 10.1126/science.267.5195.240.

Zhou, B., Martin, G., Pamment, N. (2008) Increased phenotypic stability and ethanol tolerance of recombinant *Escherichia coli* K011 when immobilized in continuous fluidized bed culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4), 627-633. DOI: 10.1002/bit.21800.

Zuroff, T.R., Xiques, S.B., Curtis, W.R. (2013) Consortia-mediated bioprocessing of cellulose to ethanol with a symbiotic *Clostridium phytofermentans*/yeast co-culture. *Biotechnology for Biofuels* 2013, 6:59. DOI: 10.1186/1754-6834-6-59.

Prispjelo/Received: 12. 2.2018

Prihvaćeno/Accepted: 1.6.2018.

Professional review

Potential of bacteria for bioethanol production from lignocellulosic raw materials

Abstract

Agriculture, forestry and food industry are sources of large quantities of lignocellulosic biomass, which can be used as an easily accessible and cheap renewable raw material for production of different bioproducts. One of these bioproducts is also bioethanol. This paper provides an overview of bacteria used and/or investigated for bioethanol production from lignocellulose-containing feedstocks. In the research of bioethanol production using bacteria, various approaches are applied in order to increase ecological and economic efficiency of bioprocess. In addition to conventional multi-stage bioprocesses that are carried out using monoculture, highly integrated (consolidated) bioprocesses and applications of microbial co-cultures are also in developing stage.

Keywords: bioethanol, lignocellulose, bacteria, hexoses, pentoses, inhibitors